

**Титова Л.В., Бровко И.С., Леонова Н.О.,
Воцелко С.К., Иутинская Г.А., Патыка В.Ф.**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, МСП, Д 03680, Украина*

РОЛЬ ЛИПКОГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ В ПОВЫШЕНИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РИЗОБИЙ И ПРОДУКТИВНОСТИ СОЕВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

*На основе природного экзополисахарида кантана и экзополисахаридакриламида разработана липкогенная композиция, добавление которой в культуральную жидкость обеспечивало увеличение жизнеспособности клеток *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 при хранении инокулянта в 26,3 раза. Введение регуляторов роста растений ивина или биосила в липкогенную композицию повышало выживаемость ризобий. Применение гелевого инокулянта *B. japonicum* способствовало активизации развития ризосферных микроорганизмов, накоплению в почве биогенных элементов и повышению продуктивности соево-ризобияльного симбиоза.*

*Ключевые слова: ризобии, экзополисахариды, полиакриламид, физиологическая активность, соя *Glycine max* (L.) Merr., симбиоз, ризосфера, продуктивность.*

Современные биотехнологии для растениеводства предусматривают использование биопрепаратов на основе почвенных микроорганизмов, соответствующих требованиям экологической безопасности и обладающих широким спектром полезного действия на растения и окружающую среду. Высококачественные микробные препараты способны сохранять высокий титр и физиологическую активность биоагентов в течение длительного времени. Актуальным является создание новых препаративных форм микробных препаратов, введение в их состав наполнителей, стабилизаторов, биологически активных веществ, гелеобразующих компонентов, способствующих не только пролонгированию сроков хранения, но и повышению адгезивных свойств биоагентов и их выживанию после инокуляции.

Улучшение адгезивных характеристик микробных препаратов может достигаться как за счёт увеличения продукции экзополисахаридов микроорганизмами-биоагентами, так и за счёт введения в культуральную жидкость гелеобразующих компонентов – силикагеля, полиакриламида, экзополисахаридов других микроорганизмов. Такие добавки должны быть безвредными для природных экосистем и человека, стабильными и обеспечивать активную жизнедеятельность интродуцированных микроорганизмов.

В настоящее время в растениеводстве широко используются липкогенные препараты, среди которых – экологически безопасный препарат экзополисахаридакриламид (ЭПАА), разработанный в Институте микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины [3, 11]. Препарат используется в технологиях выращивания сельскохозяйственных растений в качестве прилипателя. Показано, что ЭПАА увеличивает полевую всхожесть и стимулирует рост растений; повышает их устойчивость к корневым гнилям, головне, другим заболеваниям, к стрессам; продлевает срок действия микробных препаратов и пестицидов.

На основе бактериального экзополисахарида (ЭПС) кантана и ЭПАА нами разработана липкогенная композиция, введение которой в инокулянты обеспечивает выживаемость ризобий при хранении [2, 9, 12].

Целью работы было изучение роли липкогенных композиций на основе кантана и ЭПАА в улучшении качества бактериального препарата, продлении сроков его хранения, увеличении физиологической активности ризобий, а также повышении продуктивности соево-ризобияльных систем.

Материалы и методы. Объектом исследований был высокоэффективный производственный штамм клубеньковых бактерий сои *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 из коллекции отдела общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины [10].

В работе использовали липкогенные композиции на основе следующих гелевых компонентов: ЭПС кантан, продуцентом которого является *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IMB

В-8158; ЭПАА – сополимер, полученный полимеризацией акриламида (АА) и ксантана [11]. Кроме того, для повышения физиологической активности клубеньковых бактерий сои [13] в некоторые гелевые композиции вносили регуляторы роста растений ивлин или биосил (произведены в Межведомственном научно-техническом центре НАН и МОН Украины «Агробиотех»). Составы исследуемых липкогенных композиций и объемные соотношения компонентов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Соотношение компонентов исследуемых липкогенных композиций

| № п/п | Варианты липкогенных композиций | Соотношение компонентов | | |
|----------|------------------------------------|-------------------------|----------------|-------------------------------------|
| | | АА, % | ЭПС ксантан, % | PPP, $1 \cdot 10^{-10}$ мл/мл смеси |
| 1 | А | 30 | 70 | – |
| 2 | В (ЭПАА) | 70 | 30 | – |
| 3 | С | 20 % В (ЭПАА) | 80 | – |
| 4 | Д | 50 % В (ЭПАА) | 50 | – |
| 5 | Е | 30 % В (ЭПАА) | 70 | – |
| 6 | F | 30 % В (ЭПАА) | 70 | биосил |
| 7 | G | 30 % В (ЭПАА) | 70 | ивлин |

Клубеньковые бактерии сои выращивали в течение 4 суток на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): NaCl – 0,1; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $FeCl_3$ – 0,01; маннит – 10,0; глюконат кальция – 1,5; дрожжевой экстракт – 2,0; pH 7,2.

В опытах по изучению динамики выживания ризобий в стерильные флаконы вносили гелевые композиции и культуральную жидкость клубеньковых бактерий (в соотношении 1:1), перемешивали и оставляли на длительное хранение при комнатной температуре. В композиции № 6 и 7 вносили регуляторы роста растений ивлин и биосил в концентрациях $1 \cdot 10^{-10}$ мл/мл инокулянта. В контрольный вариант вместо гелевой композиции вносили стерильную водопроводную воду. Динамику выживания ризобий в инокулянте изучали, определяя количество жизнеспособных клеток методом предельных разведений с последующим высевом на агаризованную маннитно-дрожжевую среду.

Изучение эффективности гельных инокулянтов проводили на трех сортах сои: Романтика (опытные поля Уманского национального университета садоводства в Черкасской области), Алиса (опытные поля Института агроэкологии НААН Украины в Киевской области) и Аркадия одесская (производственные поля ООО «Сербское» в Одесской области). Предпосевную обработку семян контрольного варианта проводили стерильной водопроводной водой, а опытных вариантов – культуральной жидкостью *B. japonicum* (жидкий инокулянт) и свежеприготовленной смесью культуральной жидкости и липкогена Е (гельный инокулянт). При этом бактериальная нагрузка на семена была одинаковой (10^7 клеток/семя). В полевом опыте с соей сорта Романтика определяли показатели формирования и функционирования фотосинтетического аппарата (количество хлорофиллов в листьях, ассимиляционную поверхность растений, содержание сухих веществ в листьях и стеблях, чистую продуктивность фотосинтеза), урожай и его качество по общепринятым методикам. В опыте с соей сорта Алиса учитывали количество ризосферных микроорганизмов основных эколого-трофических групп [15], урожай и его качество, а также содержание биогенных элементов в почве до посева и в конце вегетационного периода. Количество микроорганизмов, мобилизирующих органофосфаты, определяли на среде Менкиной с фенолфталеинфосфатом натрия. Содержание легкогидролизуемого азота определяли по Корнфилду, обменного калия и подвижного фосфора – по Кирсанову согласно ГОСТ 4288:2004 [5].

Экспериментальные результаты обрабатывали статистическим методом дисперсионного анализа с использованием пакетов специальных программ *Microsoft Excel'03*.

Результаты и обсуждение. Как показали предварительные испытания (рис. 1), самые благоприятные условия для выживания ризобий были в варианте с композицией Е, которая содержала 30 % ЭПАА и 70 % ЭПС. В контрольном варианте численность жизнеспособных клеток за 80 суток хранения уменьшалась в 3,0 раза. При введении липкогенной композиции в состав инокулянта (1:1) титр жизнеспособных клеток *B. japonicum* УКМ В-6035 в конце срока хранения превышал контрольную величину в 26,3 раза и составлял $2,8 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл.

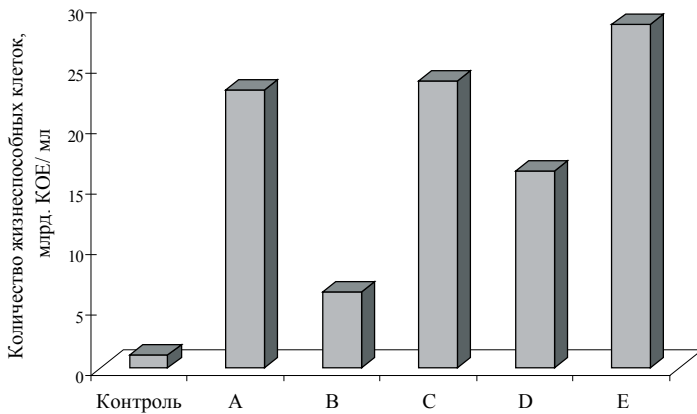


Рис. 1. Количество жизнеспособных клеток *B. japonicum* УКМ В-6035 при хранении в течение 80 суток в гелевых композициях:

**А – 30% АА + 70% ЭПС; В – 70% АА + 30% ЭПС; С – 20% В + 80% ЭПС;
D – 50% В + 50% ЭПС; Е – 30% В + 70% ЭПС.**

* Численность бактерий до хранения составляла $3,3 \cdot 10^9$ кл/мл.

** Здесь, а также на рис. 2 и в табл. 2 средние стандартные ошибки опытов не превышали 5-7 %.

Добавление в гелевый инокулянт регуляторов роста растений ивина или биосила (композиции F и G) способствовало повышению жизнеспособности клубеньковых бактерий сои. Через 50 суток хранения численность жизнеспособных клеток в этих вариантах была, соответственно, в 5,0 и 3,3 раза выше, чем в варианте с композицией E без фиторегуляторов (рис. 2).

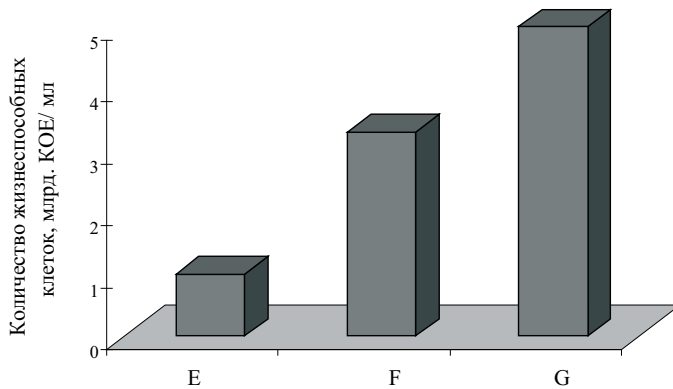


Рис. 2. Влияние гелевой композиции и регуляторов роста растений на жизнеспособность *B. japonicum* УКМ В-6035 при хранении в течение 50 суток.

* Численность бактерий до хранения составляла $1,0 \cdot 10^9$ кл/мл.

Результаты полевых испытаний гелевого инокулянта *B. japonicum* УКМ В-6035 свидетельствуют о его стимулирующем действии на растения сои. Как известно, содержание хлорофилла в листьях – один из основных факторов продуктивности растений, отражающий эффективность фотосинтетического аппарата и степень его адаптации к условиям окружающей среды. Нами показано, что при обработке семян сои сорта Романтика исследуемыми микробными препаратами содержание хлорофилла в листьях растений в варианте с жидким препаратом в фазу бутонизации составляло 109,1 %, а в варианте с гельным препаратом – 136,4 % относительно контроля без инокуляции (табл. 2). В фазе налива бобов самое высокое количество хлорофилла было отмечено в варианте с обработкой семян гелевой композицией – 138,5 % по отношению к контролю.

Следует подчеркнуть стимулирующее влияние гелевого инокулянта на развитие ассимиляционной поверхности растений сои. В фазу бутонизации площадь листьев на 1 га посевов

этого варианта увеличивалась на 34,5 %, а в фазу налива бобов – на 60,5 % по сравнению с контролем.

Одним из важных физиологических показателей, характеризующих продуктивность растений и определяющих эффективность агротехнологий во время формирования урожая, является чистая продуктивность фотосинтеза. Обработка семян сои сорта Романтика исследуемыми биопрепаратами способствовала увеличению этого показателя (табл. 2). Наивысшая продуктивность фотосинтеза была получена в варианте с обработкой семян гельным инокулянтом и составляла в фазу бутонизации 3,5 г/м² за сутки или 120,7 % относительно контроля. В этом варианте отмечалось наибольшее количество сухого вещества в надземных органах сои, которое в фазе бутонизации и в фазе налива бобов составляло, соответственно, в листьях 108,8 и 105,3 %, а в стеблях – 106,6 и 126,8 %.

Таблица 2

Влияние обработки семян жидким и гельным инокулянтами на формирование и функционирование фотосинтетического аппарата у растений сои сорта Романтика

| Вариант | Содержание хлорофилла в листьях (a+b) | | | | Ассимиляционная поверхность растений сои | | | | Содержание сухих веществ, % к контролю | | | | Чистая продуктивность фотосинтеза | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-------|-------------------|-------|--|-------|--|-------|--|--------|-------------------|--------|-----------------------------------|--------------|
| | Фаза бутонизации | | Фаза налива бобов | | Фаза бутонизации | | Фаза налива бобов | | Фаза бутонизации | | Фаза налива бобов | | | |
| | мг/г сухой массы | % | мг/г сухой массы | % | Площадь листьев на 1га, м ² | % | Площадь листьев на 1га, м ² | % | Листья | Стебли | Листья | Стебли | г/м ² за сутки | % к контролю |
| Контроль (без обработки препаратами) | 1,1 | 100,0 | 1,3 | 100,0 | 15933,0 | 100,0 | 30289,7 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 2,9 | 100,0 |
| Жидкий инокулянт | 1,2 | 109,1 | 1,5 | 115,4 | 16390,2 | 102,9 | 36664,4 | 121,0 | 102,4 | 134,3 | 103,3 | 127,3 | 3,1 | 106,9 |
| Гельный инокулянт | 1,5 | 136,4 | 1,8 | 138,5 | 21427,8 | 134,5 | 48611,2 | 160,5 | 108,8 | 106,6 | 105,3 | 126,8 | 3,5 | 120,7 |

Установлено, что в вариантах с инокуляцией в корневой зоне растений сои увеличивалась численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп (табл. 3). В фазе цветения их количество преобладало над таким в контроле в 1,5-3,1 раза, а в фазе сбора урожая – в 1,4-4,0 раза. Особенно активизировалось развитие фосфатмобилизирующих, амилолитических и прототрофных бактерий. В конце вегетационного периода в варианте с гельным инокулянтом они были наиболее многочисленными. При этом количество прототрофных микроорганизмов превышало контрольный показатель в 4 раза, фосфатмобилизирующих – в 3 раза, амилолитических – в 1,6 раза.

Таблица 3

Влияние жидкого и гельного инокулянтов на развитие микроорганизмов разных эколого-трофических групп в корневой зоне сои сорта Алиса

| Вариант | Численность микроорганизмов, КОЕ млн./г почвы | | | | |
|------------------------------|---|----------------------|-----------------|--------------|-------------------|
| | Аммонифицирующие | Фосфатмобилизирующие | Амилолитические | Прототрофные | Олигоаэро-трофные |
| Фаза цветения | | | | | |
| Контроль (без инокуляции) | 2,0±0,01 | 1,3±0,04 | 2,3±0,03 | 1,3±0,02 | 2,2±0,05 |
| Жидкий инокулянт | 3,9±0,03 | 2,3±0,05 | 7,1±0,12 | 2,2±0,07 | 4,5±0,08 |
| Гельный инокулянт | 3,6±0,09 | 1,4±0,07 | 4,1±0,10 | 2,5±0,04 | 3,3±0,07 |
| Конец вегетационного периода | | | | | |
| Контроль (без инокуляции) | 3,4±0,12 | 0,7±0,01 | 3,6±0,08 | 1,1±0,07 | 2,8±0,08 |
| Жидкий инокулянт | 3,6±0,07 | 1,9±0,02 | 5,0±0,06 | 2,9±0,04 | 4,7±0,05 |
| Гельный инокулянт | 2,4±0,08 | 2,1±0,08 | 5,8±0,08 | 4,4±0,09 | 3,8±0,09 |

Последствие инокуляции проявилось в статистически достоверном увеличении содержания основных биогенных элементов (легкогидролизуемого азота, подвижного фосфора, обменного калия) в ризосферной почве сои в период сбора урожая (табл. 4).

Таблица 4

Содержание биогенных элементов в ризосферной почве при выращивании сои сорта Алиса с применением жидкого и гельного инокулянтов

| Вариант | Содержание биогенных элементов в ризосферной почве в конце вегетационного периода | | |
|---------------------------|---|---------------------------|------------------------|
| | Легкогидролизуемого азота, мг/кг | подвижного фосфора, мг/кг | обменного калия, мг/кг |
| Контроль (без инокуляции) | 39 | 102 | 90 |
| Жидкий инокулянт | 44 | 125 | 100 |
| Гельный инокулянт | 41 | 171 | 94 |
| НСР _{0,05} | 0,12 | 0,34 | 2,02 |

Интегральным показателем эффективности агротехнологий является продуктивность растений. Применение гельного инокулянта ризобий сои в производственных условиях позволило получить прибавки урожая зерна на трех сортах сои: Аркадия одесская – 23,5 %, Алиса – 25,1 %, Романтика – 31,2 % (табл. 5), что составило, соответственно, 6,0, 5,1 и 4,3 ц/га. При этом увеличивался вес 1000 семян у сои сорта Романтика – на 8,0 % относительно контроля и на 5,2 % относительно варианта с жидким инокулянтом, а у сои сорта Алиса – на 11,9 % относительно контроля.

Таблица 5

Влияние разных препаративных форм инокулянта на продуктивность сои сортов Романтика, Алиса и Аркадия одесская (полевые опыты)

| Вариант | Урожай сои сорта | | | | | |
|---------------------|------------------|--------------|------------------|--------------|-------|--------------|
| | Романтика | | Аркадия одесская | | Алиса | |
| | ц/га | % к контролю | ц/га | % к контролю | ц/га | % к контролю |
| Контроль | 13,8 | 100,0 | 19,5 | 100,0 | 20,3 | 100,0 |
| Жидкий инокулянт | 16,2 | 110,1 | 22,5 | 113,3 | 23,2 | 114,3 |
| Гельный инокулянт | 18,1 | 131,2 | 25,5 | 123,5 | 25,4 | 125,1 |
| НСР _{0,05} | 1,94 | | 0,3 | | 1,1 | |

Таким образом, сочетание полезных свойств сополимера экзополисахаридакриламида и бактериального экзополисахарида кантана в разработанной нами липкогенной композиции позволило улучшить качество и повысить эффективность инокулянта клубеньковых бактерий.

Подходы к изготовлению гельных форм микробных препаратов на основе полиакриламида были разработаны в 1979 г. Y.R. Dommergues и соавт. [17]. Немного позже G. Jung с соавт. предложили использовать с этой целью другие биополимеры (альгинат, кантан, камедь рожкового дерева) [21]. Живые микробные клетки, включенные в гель этих полимеров, оказывались защищенными от действия неблагоприятных факторов среды, а после внесения в почву полимер разлагался, освобождая микроорганизмы.

Гельные препараты имеют ряд преимуществ и, по данным многих авторов, часто оказываются более эффективными, чем жидкие [7, 8, 16, 18, 20].

Гелеобразующие полимеры, покрывая семена воздухо- и водорегулирующей пленкой, способствуют повышению устойчивости растений к стрессам и фитопатогенам в ранних фазах онтогенеза. Кроме того, они оказывают защитное действие на интродуцируемые и аборигенные почвенные микроорганизмы от повреждающего действия экстремальных факторов (температуры, высушивания, УФ-радиации) [14, 22].

Известно, что ЭПС микроорганизмов принимают участие в ряде биологических процессов, протекающих в почве: образовании гумуса и формировании структуры почвы [23]; создании биопротекторного эффекта по отношению к гуминовым кислотам [1]; образовании комплексных металлоганических соединений, из которых растения могут потреблять труднодоступные элементы питания [6]. Эти полимеры могут также влиять на интенсивность азотфиксации [8, 18].

Данные литературы свидетельствуют о трофической роли ЭПС как для самих продуцентов, так и для сопутствующих бактерий, что позволяет рассматривать эти вещества как важный фактор, влияющий на функционирование микробных сообществ почвы [1]. Как показали наши исследования, гельный инокулянт способствовал активизации развития в ризосфере сои микроорганизмов основных эколого-трофических групп, особенно прототрофных, фосфатомобилизирующих и амилитических.

Микроорганизмы способны использовать внеклеточные полисахариды в качестве энергетических субстратов и источника электронов в реакциях дегидрирования, являющихся обязательным этапом окислительно-восстановительных процессов в микробной клетке, а также в качестве источников углеродного питания, включая ЭПС или продукты их деструкции в конструктивный обмен [4].

По данным М. Grula, почвенные микроорганизмы могут использовать в качестве субстрата и утилизировать азот полиакриламида, отщепляя аммонийные группы [19]. Показано также, что сульфатредуцирующие микроорганизмы способны использовать полиакриламид в качестве донора электронов.

Наблюдаемое нами увеличение сроков поддержания высокого титра ризобий сои в гелевом инокулянте может свидетельствовать об использовании бактериями компонентов липкогенной композиции в качестве субстрата. Введение этой композиции в состав инокулянта, по-видимому, способствовало повышению экологической пластичности ризобий. Кроме того, отмечалось лучшее развитие микроорганизмов основных эколого-трофических групп, что положительно отразилось на продуктивности сои и показателях плодородия почвы.

Следует подчеркнуть, что полевые опыты проводились в условиях засухи. Так, по гидрометеорологическим данным в Черкасской области апрель 2009 года характеризовался отсутствием осадков, а в мае и июне, в период активного роста растений и формирования симбиоза, количество осадков было, соответственно, на 31,2 и 41,7 % ниже среднемесячной нормы. В августе, когда растения находились в фазе налива бобов, осадков выпало в 13,3 раза меньше нормы. Вероятно, в этих условиях инокулированные гелевым препаратом растения и их микросимбионты были защищены от засухи, и симбиотический аппарат функционировал более активно. Бактериальные симбионты в составе липкогенного инокулянта быстрее адаптировались к неблагоприятным факторам среды и были лучше обеспечены питательными веществами, чем в варианте с жидким инокулянтом.

Таким образом, гелевые композиции на основе природного экзополисахарида ксантана и ЭПАА являются перспективными компонентами для повышения качества микробных препаратов с пролонгированным сроком хранения и стабильными свойствами. Гелевые микробные препараты обладают стимулирующим и адаптогенным действием на растения.

Л.В. Титова., І.С. Бровко, Н.О. Леонова, С.К. Воцелко, Г.О. Іутинська, В.П. Патица

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

РОЛЬ ЛИПКОГЕННИХ КОМПОНЕНТІВ У ПІДВИЩЕННІ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ РИЗОБІЙ ТА ПРОДУКТИВНОСТІ СОЄВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ

Резюме

На основі природного екзополісахариду ксантану і екзополісахаридакриламиду розроблена липкогенна композиція, додавання якої в культуральну рідину забезпечувало збільшення життєздатності клітин *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 при зберіганні инокулянту в 26,3 рази. Введення регуляторів росту рослин івіну або біосилу в липкогенну композицію підвищувало життєздатність ризобій. Застосування гельного инокулянту *B. japonicum* сприяло активізації розвитку ризосферних мікроорганізмів, накопиченню в ґрунті біогенних елементів і підвищенню продуктивності соєво-ризобіального симбіозу.

Ключові слова: ризобії, екзополісахариди, поліакриламід, фізіологічна активність, соя *Glycine max* (L.) Merr., симбіоз, ризосфера, продуктивність.

ROLE OF STICKY-GENE COMPONENTS IN THE INCREASE OF RHIZOBIA PHYSIOLOGICAL ACTIVITY AND PRODUCTIVITY OF SOYBEAN- RHIZOBIA SYMBIOSIS

S u m m a r y

On the basis of natural exopolysaccharide xanthan and exopolyacrylamide the sticky-gene composition has been developed. Addition of that composition to the culture medium provided a 26.3 times higher viability of *Bradyrhizobium japonicum* UCM B-6035 cells during its storage. Introduction of plant growth regulators biosil or ivin into this composition increased the survival of rhizobia. Application of gel inoculant *B. japonicum* favored more intensive growth of rhizosphere microorganisms, nutrient's accumulation in the soil and increased productivity of soybean-*Rhizobium* symbiosis.

The paper is presented in Russian.

Key words: rhizobia, exopolysaccharides, polyacrylamide, physiological activity, soybean *Glycine max* (L.) Merr., symbiosis, rhizosphere, productivity.

The author's address: Tytova L.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Андреев Е.И., Иутинская Г.А., Изжеурова В.В., Васильев В.Н., Кизель Н.Ф., Иванова Н.И. Использование бактериальных экзополисахаридов ассоциациями почвенных микроорганизмов // Микробиол. журнал. – 1986. – 48, № 1. – С. 15–21.
2. Верхотурова І.С. Збереження життєздатності *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* в гелевих композиціях на основі липкогену ЕПАА // Матеріали V міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 12-15 травня 2009р.): Тез. доп. – Львів, 2009. – С. 215.
3. Воцелко С.К., Гвоздяк Р.І., Данкевич Л.А., Литвинчук О.О., Патица В.П. ЕПАА – універсальний біологічний прилипач пестицидів і регуляторів росту рослин (Методичні рекомендації) – К., 2007. – 26 с.
4. Гоголева Е.В., Гречушкіна Н.Н., Егоров Н.С. Экзополисахарид *Mycobacterium lacticolum* штамм 121 // Тез. докл. V съезда Всесоюз. микробиол. о-ва. – Ереван, 1975. – С. 118.
5. Електронний збірник основоположних національних стандартів України в галузі ґрунтознавства, агрохімії та охорони ґрунтів. – Харків: ННЦ «Інститут ґрунтознавства та агрохімії імені О.Н. Соколовського», Технічний комітет стандартизації ТК 142 «Ґрунтознавство», 2008.
6. Зак Г.А. Роль хелатирующих бактерий в почвенном питании растений // Тез. докл. V съезда Всесоюз. микробиол. о-ва. – Ереван, 1975. – С. 91–96.
7. Каменева І.А., Грітчина Л.Ю., Мельничук Т.М., Патица В.П., Воцелко С.К., Алексєнко Н.В. Перспектива розробки гельних препаратів на основі агрономічно корисних мікроорганізмів // Матеріали XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (25–30 травня 2009 р.) – Ужгород: Ужгородський національний університет, 2009. – С. 376.
8. Кругова О.Д., Мандровська Н.М., Охріменко С.М. Вплив бактеріального екзополісахариду на ефективність симбіотичної азотфіксації рослин гороху і сої // Физиол. и биохимия культ. раст. – 2003. – 34, № 3. – С. 239–244.
9. Леонова Н.О., Гергалло І.С., Титова Л.В., Воцелко С.К., Иутинская Г.А. Влияние липкогена «ЭПАА» и гелевых композиций на жизнеспособность клубеньковых бактерий сои // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. – Минск: Изд. И.П. Логвинов, 2008. – Т. 2. – С. 81–84.
10. Патент України 3324 UA, МКІ¹ C1 C05 F 11/08, C 12 N 1/20 Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для одержання добрив під сою / Скочинська Н.М., Антипчук А.Ф., Рангелова В.М., Канцелярук Р.М., Танцюренко О.В. // Опубл. 1994. – Бюл. № 6–1.
11. Патент України UA 24856A C 08F 120/56 Спосіб одержання співполімеру поліакриламід (ЕПАА) / Видющенко Є.М., Воцелко С.К., Гвоздяк Р.І., Гнідець В.П., Литвинчук О.О., Сарібсков Г.С., Болоховська В.А. // Опубл. 15.02.2002. – Бюл. № 10.
12. Патент України UA 89120 C12 №1/00, A 01C 1/00 Композиція для інокуляції насіння бобових рослин на основі бульбочкових бактерій та липкогену ЕПАА / Леонова Н.О., Воцелко С.К., Титова Л.В., Гергалло І.С., Иутинская Г.О., Патица В.П. // Опубл. 25.12.2009. – Бюл. № 24.

13. Патент України на корисну модель № 37579 Спосіб підвищення активності мікробних препаратів / Іутинська Г.О., Титова Л.В., Валагурова О.В., Козирицька В.Є., Леонова Н.О., Петрук Т.В., Білявська Л.О. // Опубл. 10.12.2008. – Бюл. № 23.
14. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малашенко Ю.Р. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter sp.* // Микробиология, – 1997. – 66, № 3. – С. 335–340.
15. Tenner E.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов / под. ред. В.К. Шильниковой. –М.: Дрофа, 2005. – 256 с.
16. Шерстобоева Е.В., Дудинова И.А., Крамаренко С.Н., Шерстобоев Н.К. Биопрепараты азотфиксирующих бактерий: проблемы и перспективы применения // Микробиол. журн. – 1997. – 59, № 4. – С. 109–117.
17. Dommergues Y.R., Diem H.G., Divies C. Polyacrylamide-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – 37, N 4. – P. 779–781.
18. Elegba M.S., Rennie R.J. Effect of different inoculant adhesive agent on rhizobial survival, nodulation and nitrogenase (acetylene-reducing) activity of soybeans (*Glycine max (L.) Merrill*) // Can. J. Soil Science. – 1984. – 64, N 4. – P. 631–636.
19. Grula M., Huang May-Lin, Sewell G. Interactions of certain polyacrilamides with soil bacteria // Soil Sci. – 1994. – 158, N 4. – P. 291–300.
20. Jawson M.D., Franzluebbbers A.J., Berg R.K. *Bradyrhizobium japonicum* survival in and soybean inoculation with fluid gels // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – 55, N 3. – P. 617–622.
21. Jung G., Mugnier J., Diem H.G., Dommergues Y.R. Polymer-entrapped rhizobium as an inoculant for legumes // Plant Soil. – 1982. – 65, N 2. – P. 219–231.
22. Kremer R.J., Peterson H.L. Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – 45, N 6. – P. 1790–1794.
23. Martin J.P. Decomposition and binding action of polysaccharides in soil // Soil. Biol. Biochem. – 1971. – 3, N 1. – P. 33–41.

Отримано 13.09.2011

УДК 577.152.32

Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д 03680, Украина*

ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА α -L-РАМНОЗИДАЗЫ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* 1001

*Из культуральной жидкости *Cryptococcus albidus* 1001 фракционированием сульфатом аммония, хроматографией на TSK-гелях Toyopearl HW-60 и Fractogel DEAE-650-s, а также на Sepharose 6B выделена α -L-рамнозидаза. Фермент очищен в 42 раза, его выход 0,7 %. Ферментный препарат не содержал других гликозидазных (кроме β -D-глюкозидазной) и протеолитической активностей. Молекулярная масса фермента по данным гель-фильтрации на Sepharose 6B составила 50 кДа. α -L-Рамнозидаза стабильна в течение 2 суток при 20 °С. рН-Оптимум составил 4,0-5,0, термооптимум 60 °С.*

*Ключевые слова: *Cryptococcus albidus* 1001, α -L-рамнозидаза, β -D-глюкозидаза, очистка, рН- и термооптимум, рН- и термостабильность.*

α -L-Рамнозидаза (α -L-рамнозид-рамногидролаза – К.Ф. 3.2.1.40) гидролитически отщепляет концевые невосстановленные α -1,2, α -1,4 и α -1,6 связанные остатки L-рамнозы в α -L-рамнозидах: гликолипидах, гликозидах, камедях, пигментах, смолах, специфических иммунополисахаридах, гетерополисахаридах бактериальных клеточных стенок, биофлаваноидах [2]. α -L-Рамнозидазу синтезируют некоторые млекопитающие, растения, грибы и бактерии. Изучены бактериальные продуценты α -L-рамнозидаз среди фитопатогенных бактерий *Corticium rolfii*, представителей кишечной микрофлоры человека — *Bacteroides*, *Sphingomonas sp.* и природных изолятов, например, *Clostridium stercorarium*, выделенного из геотермального

© Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец, 2012